

**Wirkungen nativer, denaturierter und
hydrolysiertes Desoxyribonuklease 1
auf die Vermehrung von Bäckerhefe**

Gerhard Tuschy

1962

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt am Main
(Direktor : Professor Dr. E. Heinz)

WIRKUNGEN NATIVER, DENATURIERTER UND HYDROLYSIERTER
DESOXYRIBONUKLEASE I AUF DIE VERMEHRUNG VON BÄCKERHEFE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der gesamten Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Gerhard Tuschy

aus Danzig

Frankfurt am Main 1962

Dekan : Prof. Dr. K. Herzberg

Referent : Prof. Dr. Rudolf K. Zahn

Korreferent : Prof. A. Wacker

mündliche Prüfung : 5.7.1962



Inhalt

	Seite
I <u>Vorwort</u>	4
II <u>Einleitung</u>	5
Zur Entwicklung der DNase-Forschung	5
Hefe und DNase	10
Vorkommen und Spezifität der DNasen	10
III <u>Zusammenfassung der Arbeit</u>	12
IV <u>Diskussion</u>	13
V <u>Methodik</u>	16
die verwendete DNase; Bäckerhefe	17
Nährlösung	17
kontinuierliche Hefezüchtung	18
Rollertube; Bakterienwachstum	19
Ansatz, Verlauf und Auswertung der Versuche	20
Statistische Sicherung der Ergebnisse, x-Test	25
VI <u>Versuche und Tabellen mit Diskussion</u>	27
VII <u>Eine Theorie der biologischen DNase-Wirkung</u>	37

Vorwort

In dieser Arbeit werden die biologischen Wirkungen der Desoxyribonuklease I auf die Bäckerhefe untersucht. In Fortführung der Versuche von Ochs (1), der erstmalig die Desoxyribonuklease I (DNase I) an der Bäckerhefe testete, sollte eine Antwort auf folgende Fragen gefunden werden :

Ist die Bäckerhefe ein geeignetes Objekt für die Untersuchung der biologischen Wirkungen der DNase ?

Kann der wachstums- und entwicklungsfördernde Einfluß der DNasen auf ein- und vielzellige Organismen (22-27) an der Hefe bestätigt und differenziert werden ?

Ist für die biologische DNase-Wirkung ein intaktes DNase-Molekül notwendig oder nur Teile davon ?

Ist denaturierte und schrittweise hydrolysierte DNase an der Hefe noch biologisch aktiv ?

An dieser Stelle habe ich Herrn Prof. Dr. Rudolf K. Zahn zu danken, nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch dafür, daß er weder Zeit noch Mühe scheute, mich in die wissenschaftliche Arbeits- und Denkweise einzuführen und mir bei der Versuchsplanung und Interpretation der Ergebnisse zu helfen.

Mein Dank gebührt ferner Frau Annesuse Hagedorn, Frl. cand. med. Gaby Mey und Frl. Marianne Zirker, die mir bei der Durchführung der Versuche behilflich waren.

Schließlich möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft meinen Dank für die materielle Unterstützung dieser Arbeit aussprechen.

Seitdem man intensiv an die Erforschung der Desoxyribonukleinsäuren (DNS) herangegangen ist, rückten auch die DNasen in den Mittelpunkt des Interesses. Allfrey und Mirsky (2) untersuchten 1952 die DNase-Konzentrationen in verschiedenen tierischen Geweben. Es zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Proliferation und Regeneration der Gewebe und deren DNase-Aktivitäten: "Tissues which are capable of high mitotic activity have high DNase concentrations".

Beim Kalb ergibt sich folgende Reihenfolge:

Gehirn und Erythrozyten enthalten keine, die Niere wenig DNase; die Schleimhaut des Intestinaltraktes zeichnet sich durch mittlere DNase-Aktivitäten aus, während in der Milz die höchsten Werte gefunden werden.

Ferner stellte es sich heraus, daß in allen untersuchten Geweben die DNase-Aktivität und der N^{15} -Umsatz der DNS parallel gehen (2).

Diese Befunde von Allfrey und Mirsky konnten von Siebert et al. (3) grundsätzlich bestätigt werden. Um so verwunderlicher will es erscheinen, daß in der folgenden Zeit viele dem widersprechende Aussagen gemacht wurden.

Allfrey, Mirsky und Osawa (4) untersuchten den Einbau markierter Aminosäuren unter verschiedenen Bedingungen in das Protein isolierter Zellkerne. Unter DNase-I-Einwirkung stieg die Einbaurate zunächst um 30% an, um dann stark unter normale Werte abzufallen. Den Untersuchern imponierte die schließlich resultierende Hemmung mehr als die anfängliche Steigerung, und sie zogen die Möglichkeit einer DNase-Überdosierung offenbar nicht in Betracht.

Lester (5) und Beljanski (6) erforschten ebenfalls den Einbau markierter Aminosäuren in Protein unter DNase-I-Einwirkung. Sie stellten sich ein gut funktionierendes Enzym-Substrat System mit Lysaten von Mikrokokkus Lysodeiktitus her. Dabei ergibt sich eine deutliche Steigerung der Einbaurate der Aminosäuren durch DNase I.

Beljanski kann keinen Einfluß der DNase I auf intakte Bakterien feststellen.

Chevremont (7) findet sogar eine hochgradige Verminderung der Mitoserate durch DNase I in Kulturen von Fibroblasten aus Hühnerembryonen. Er wählte Fermentkonzentrationen von 0,1 - 0,3 mg/ml bzw. 1 - 3 mg/ml, die in normalen Zellen niemals vorkommen, d. h. die völlig unphysiologisch sind. So ist es nicht verwunderlich, daß derart hohe DNase-Mengen zu morphologisch faßbaren Veränderungen der Zellstruktur und dem weit-

gehenden Verlust der Teilungsfähigkeit der Zellen führen (7).

Gilissen (8) bestimmte die Größe des penicillinresistenten Anteils von Bakterienkulturen unter DNase-I-Einwirkung. Danach verursachen 0,4 mg/ml DNase eine signifikante Verminderung der überlebenden Bakterien.

Necas (9) findet keine Wirkung von DNase auf Wachstum und Entwicklung von Hefezellen und Hefeprotoplasten. Er macht jedoch keine Angaben über Art und Reinheit der verwendeten DNase.

Die Ergebnisse der bisher angeführten Autoren sind widersprüchlich. Alles wurde für die DNase gefunden, daß sie fördernd, hemmend oder überhaupt nicht wirken.

Mit Bestimmtheit läßt sich hier aber feststellen : diejenigen Autoren, die der DNase einen hemmenden Einfluß auf den Einbau von Aminosäuren in Protein bzw. auf das Wachstum von Zellen zuschreiben, haben in ihren Versuchen das Ferment in Konzentrationen über 0,1 mg/ml gegeben.

In neuerer Zeit sind Brody und Thorell (10) den Anregungen von Allfrey und Mirsky gefolgt. Sie fanden in regenerierendem Knochenmark die DNase-Aktivitäten erheblich über die Norm erhöht. Der Vergleich der DNase-Aktivitäten in normaler, regenerierender und carcinomatöser Leber ergibt folgende Werte (11):

regenerierende Leber :	stark erhöht
Leber-Carcinom, frühe Stadien :	mäßig erhöht
Leber-Carcinom, späte Stadien :	erniedrigt

Dabei ist die Erhöhung der DNase-Aktivität jeweils vor der Steigerung der Mitoserate feststellbar. Die Abnahme der Werte beim älteren Tumor wird leicht verständlich, wenn wir z.B. die Befunde von Goldacre und Sylvén (12) und Malmgreen und Sylvén (13) berücksichtigen. Sie weisen nach, daß nur die äußeren Randzonen des voll ausgebildeten Tumors genügend mit Blut versorgt werden und durch einen lebhaften Stoffwechsel gekennzeichnet sind. In den inneren Anteilen des Tumors sind die Fermentaktivitäten stark herabgesetzt bzw. geschwunden, wenn die Zellen nekrotisch werden.

Zur DNase-Bestimmung maligner Tumoren sollte man also nur die Zellen der Randzonen mit ihrer Fähigkeit zu wildem infiltrativen Wachstum heranziehen. Wir neigen zu der Ansicht, daß die von Allfrey, Mirsky und Brody für normales Wachstum festgestellte Korrelation zwischen DNase-Aktivität und DNS-Produktion auch für entartetes Wachstum besteht.

Für einen derart generellen Zusammenhang sprechen auch Beobachtungen von Kunkee und Pardee (14). Sie fanden als erste, daß nach Phagen-

Infektion von Bakterien eine DNase-Aktivitätssteigerung zustande kommt, die mit Phagen-DNS-Bildung in Zusammenhang steht. Eine Blockierung der DNase-Aktivierung verhindert das Angehen der Infektion.

Wie Kowlessar und Altmann (15) berichten, kommt es nach Röntgenbestrahlung von Ratten zu einem Anstieg des DNase-Spiegels im Blut. Zur Erklärung dieses Phänomens bieten sich zwei Überlegungen an :

1. Die DNase wird durch Zelluntergang frei.
2. Die Steigerung des DNase-Spiegels im Blut ist eine aktive Leistung des Organismus, um die durch den Zelluntergang freigewordene DNS abzubauen. Nach einer solchen Arbeitshypothese können unter Umständen die DNasen DNS abbauen, die an einen falschen Platz geraten ist.

Seit den Versuchen von Zahn et al. (16) kann diese Vorstellung einige Wahrscheinlichkeit für sich beanspruchen. DNS wurde in die Blutbahn von Kaninchen gespritzt und so eine "reaktive" DNase-Steigerung ausgelöst.

Wenn nach Allfrey und Mirsky (2) eine Steigerung der DNS-Synthese mit einer erhöhten DNase-Aktivität verbunden ist, müssen wir Überlegungen darüber anstellen, ob

1. die DNS-Produktion und die DNase-Aktivitätssteigerung überhaupt parallel gehen, ob
2. eine Steigerung der DNase-Aktivität erhöhten DNS-Umsatz durch Abbau bewirkt, oder ob
3. erhöhte DNase-Aktivität einen Anstieg der DNS-Synthese bewirkt.

Befunde von Paschkis (17), Lettré (18), Friedrich-Frekxa (19) et al. könnten als Hinweis auf die unter 3. angeführte Möglichkeit gelten. Aus regenerierenden Geweben, für die Brody (10, 11) eine DNase-Aktivitätssteigerung nachgewiesen hatte, kann offenbar eine mitosefördernde Substanz frei werden. Nach Paschkis (17) wird das Wachstum gewisser Tumoren durch gleichzeitig ablaufende Leberregeneration signifikant beschleunigt. Bei partiell hepatektomierten Ratten soll sogar die Mitoserate in der Cornea erhöht sein. Das Serum solcher Versuchstiere bewirkt in der Leber intakter Ratten eine Mitosewelle. Einen weiteren Hinweis in dieser Richtung erhalten wir z. B. von White (20), der empfiehlt, zu Zellkulturen Extrakte schnell wachsender Gewebe zuzusetzen. Über die Natur eines solchen mitosefördernden Faktors ist damit zunächst noch nichts ausgesagt.

Nach Befunden von Lettré und Thom (18) müssen Zell- bzw. Zellkernbestandteile einen mitosefördernden Faktor enthalten. Die beiden Untersucher konnten nämlich im Mäuse-Ascites-Carcinom die Mitoserate erhöhen, indem sie den Mäusen Homogenisate des gleichen Tumors spritzten.

Es muß zugegeben werden, daß diese Befunde nicht spezifisch sind und kein zwingender Grund zur Annahme vorliegt, daß es sich bei dem hypothetischen mitosefördernden Stoff um DNase handelt. Auffallend ist jedoch, daß jene Substanz offenbar besonders von rasch wachsenden und regenerierenden Geweben gebildet wird, die in jedem Fall durch erhöhte DNase-Aktivitäten gekennzeichnet sind. Einen deutlicheren Hinweis verdanken wir jüngsten Mitteilungen von Eagle (21). Danach ist in einem Pankreasextrakt, der alle Pankreasenzyme - also auch die Pankreas-DNase enthält, ein Protein mit relativ niedrigem Molekulargewicht enthalten, das das Wachstum einer Zellkultur in einem proteinfreien synthetischen Medium stark beschleunigt.

Jetzt galt es, in Gewebekulturen oder Zellsuspensionen den intrazellulären DNase-Spiegel zu heben, bzw. die intrazelluläre DNase-Aktivität zu steigern. Würden die Zellen daraufhin schneller wachsen oder sich gar schneller teilen? Am besten konnte man den intrazellulären DNase-Spiegel heben, indem man dem Suspensionsmedium der Zellen DNase zugab. Seit den Versuchen von Chevremont (7), der intrazelluläre Veränderungen durch DNase-Zusatz zu Zellsuspensionen erzielen konnte, durfte man annehmen, daß DNase-Moleküle in Zellen eindringen können. Darüber hinaus legten es die Befunde von Allfrey, Mirsky und Osawa (4) nahe, daß das DNase-Molekül auch in den Zellkern eindringen kann.

So schien die Frage nach den Folgen einer Steigerung des intrazellulären DNase-Spiegels experimentell lösbar. Die Versuche, die andere Autoren zur Klärung dieses Problems unternommen hatten, waren für uns unbefriedigend. Entweder arbeitete man am ungeeigneten Objekt, oder man dosierte die DNase zu hoch.

Die Wirkung der DNase I auf Seeigeleier. Da die Regelung der DNase-Aktivität mit Regeneration, Wachstum und Entwicklung verknüpft sein mußte, lag es auf der Hand, den Einfluß dieses Ferments auf Seeigeleier zu erforschen. Die Entwicklung dieses klassischen Untersuchungsobjektes ist genau bekannt und läßt sich gut unter dem Mikroskop verfolgen; Meerwasser als Suspensionsmedium mußte wegen seines pH-Wertes und seines Reichtums an Mg^{++} -Ionen die DNase I optimal aktivieren. Zahn (22, 23) arbeitete zunächst mit den beiden in der Adria vorkommenden Arten *Arbacia pustulosa* und *Sphaerechinus granularis*. Dabei ergab sich unter DNase-I-Einwirkung eine hochsignifikante Steigerung der Teilungsgeschwindigkeit der befruchteten Eier. Diese Befunde konnten an der in der Nordsee lebenden Seeigelart *Psammechinus miliaris* bestätigt werden (24). Die DNase wurde dabei in Konzentrationen von $1 - 10 \times 10^{-6}$ g/ml dem Meerwasser zugesetzt.

Die Wirkung der DNase I auf Amphibieneier. In der Zahn'schen Arbeitsgruppe testete Kiefer (25) die DNase I an Amphibieneiern. Danach verkürzten Konzentrationen des Ferments von $1-10 \times 10^{-6}$ g/ml signifikant die Teilungszeit befruchteter Eier des Grasfrosches. DNase-Konzentrationen, die das 5-10 fache davon betrugen, bewirkten eine hochsignifikante Verlängerung der Teilungszeit. Damit konnte die von Chevrement (7) gefundene Hemmung der Zellteilung bei hohen DNase-Konzentrationen bestätigt werden.

Die Wirkung der DNase I auf andere Organismen und auf Warmblütler. Der typische DNase-Effekt, die Beschleunigung der Zellteilung, läßt sich auch an den Einzellern *Euglena gracilis* (26), *Glaucoma piriformis* und *Mikrokokkus* (27) nachweisen. Auch in menschlichen Gewebekulturen konnte durch DNase die Mitoserate erhöht werden (27).

Es konnte ein DNase-Effekt auch am Warmblütler beobachtet werden. Im Kaninchenblut wurde nach DNase-Injektion eine Steigerung der Retikulozytenzahl festgestellt (28).

Um den an den verschiedenen Einzellern, an Gewebekulturen und am Warmblütler beobachteten DNase-Effekt zu deuten, waren weitere Versuche erforderlich.

Zunächst galt es auszuschließen, daß die DNase-Wirkung unspezifisch ist, d. h. auch durch ein der DNase ähnliches Protein zu erzielen. Rinderserumalbumin, in Molekulargewicht und Aminosäurezusammensetzung der DNase weitgehend entsprechend, hat keinen Einfluß auf die Entwicklung von befruchteten Seeigeleiern (24).

Dann mußte an eine extrazelluläre DNase-Wirkung gedacht werden. Die DNase depolymerisiert *in vitro* DNS; und es wäre denkbar, daß die DNase extrazelluläre, von toten Zellen stammende DNS abbaut. Die frei werden den Nukleotide könnten dann als DNS-Bausteine in die Zellen eindringen und die DNS-Syntheserate erhöhen. Wenn diese Überlegung richtig ist, dann muß Seeigeleiern zugesetztes Nukleotid oder DNS + DNase deren Entwicklung beschleunigen. Beides ist nicht der Fall. Artfremde und arteigene DNS heben die entwicklungsbeschleunigende Wirkung der DNase auf Seeigeleier sogar auf (24). So konnte es wahrscheinlich gemacht werden, daß der biologische DNase-Effekt nicht durch extrazelluläre Hydrolyse von DNS zustande kommt.

Die Wirkung denaturierter DNase. Durch Hitzedenaturierung im kochenden Wasserbad verliert die DNase ihre biologische Wirksamkeit auf die Entwicklung von Seeigelkeimen (24).

Amphibien- und Seeigelleiern als Untersuchungsobjekt für DNase haftet ein entscheidender Mangel an : Froscheier sind nur im Frühjahr erhältlich, bei der Arbeit mit Seeigelleiern ist man ebenfalls jahreszeitlich gebunden und außerdem an ein meeresbiologisches Institut angewiesen. Zudem erfordert der Umgang mit solchen Keimen viel Zeit und Geduld.

Es galt, ein Standardobjekt für die DNase zu finden, das gleichmäßig über das ganze Jahr erhältlich, nicht zu teuer und einfach zu handhaben ist.

Auf der Suche nach einem solchen Organismus erprobte Ochs (1) die Bäckerhefe.

Ochs konnte auch an der Bäckerhefe (*saccharomyces cerevisiae*) den mitosefördernden Effekt der DNase I bei geeigneter Dosierung sicherstellen. Dabei entwickelte er eine brauchbare Technik, wie man jederzeit mit relativ geringem Aufwand die spezifischen biologischen Wirkungen der DNasen testen kann. Wie später noch genauer auszuführen ist, läßt man die Hefe, in einer Zucker-Salzlösung suspendiert, einige Zeit stehen und bestimmt dann in den DNase- und Kontrollansätzen lichtelektrisch die Zellvermehrung. Die Fehlerbreite dieser einfachen Methode ist so gering, daß das schnellere Wachstum bzw. die schnellere Vermehrung der mit DNase angesetzten Hefe gegenüber den Kontrollansätzen signifikant wird.

Vorkommen und Spezifität der DNasen.

Es sind bisher die verschiedensten tierischen und pflanzlichen DNasen bekannt. Davon hat man die Pankreas-DNase-I am besten untersucht. Es handelt sich um ein Fermentprotein, das in vitro DNS hydrolytisch derart spaltet, daß an C₅ der Desoxyribose veresterte Nukleotide entstehen. Das pH-Optimum liegt im neutralen Bereich; zur Aktivierung sind Mg⁺⁺-Ionen notwendig. Wir haben (auf der nächsten Seite) die wichtigsten Daten der In-vitro-Wirkung der DNase I in einer Tabelle zusammengefaßt.

Daneben kennt man seit langem eine "saure" DNase, die sogenannte DNase II, die ihre höchste Aktivität bei pH 5 besitzt und die zur Aktivierung keine Mg⁺⁺-Ionen benötigt. Dabei hat man besonders eine Milz-DNase-II (29) und eine hochgereinigte Thymus-DNase-II (30) genau untersucht.

Die DNasen I und II kommen in einigen Organen nebeneinander vor, so in Milz, Leber, Thymus, Niere und Pankreas (3, 31, 32). Die DNase vom Typ II scheint aber regelmäßiger anzutreffen zu sein als die vom Typ I.

In-vitro-Wirkung reiner Desoxyribonuklease I aus Rinderpankreas (Worthington)

Vermutliche Konzentr.

1) in verschied. Zellen	0,01 - 3	10^{-6} g/ml	N. B. Kurnick: Arch. Biochem. Biophys. <u>43/97</u> , 53
2.) im Pankreas	150	10^{-6} g/ml	W. Baumgarten et al. Arch. Biochem. Biophys. <u>77/206</u> , 1958

Einheiten	10^4 E	entsprechend ca. S. Zamenhof et al. :
	10^{-3} g	Worth. -DNase J. Biol. Chem. <u>180/727</u> , 59

Molekulargewicht	$6 \cdot 10^4$	W. S. Spektor : Handbook of Biol. Data, London G. Gehrman et al. : Biochem. Biophys. Acta <u>23/621</u> , 1957
------------------	----------------	---

Iso-elektrischer Punkt	pH 5,0	W. S. Spector : Handbook of Biological Data London 1956
------------------------	--------	--

pH-Wirkungsoptimum	pH 7,0	G. S. Wiberg : Arch. Biochem. Biophys. <u>73/337</u> , 1958
Aktivatoren	Mg, Ca ⁺⁺ (Mn ⁺⁺) 0,05 M	

1) unspezifische Inhibitoren	Komplexon, Phenol	O. D. Kowlessar et al. : Arch. Biochem. Biophys. <u>54/355</u> , 1955 H. H. Henstell et al. : Canc. Res. <u>12/346</u> , 1952
2) spezifische	Extrakt aus Knochenmark, Blutzellen Coop Gland Inhibitor	W. Dabrowska et al. : J. Biol. Chem. <u>177/991</u> , 1949

Klassifizierung	Endonuklease	M. Laskowski : Ann. N. Y. Acad. Sci. <u>81/776</u> , 1959
-----------------	--------------	---

Spaltstücke	Im Mittel Tetra-Nukleotide 16% Di-Nukleotide ca. 1% Mononukleotide Nukleosid-5'-Phosph.	J. L. Potter et al. : J. Biol. Chem. <u>233/915</u> , 1959 R. L. Sinsheimer et al. : Science <u>144/92</u> , 1958 M. Laskowski : Ann. N. Y. Acad. Sci. <u>81/776</u> , 1959
-------------	--	---

Vorzugsweise gespaltene Bindung		G. Gehrman et al. : Biochem. Biophys. Acta <u>23/621</u> , 1957
nie gefundene Bruchstücke	p-u-----p-y	

Häufig gefundene Spaltprodukte	p-y-p-...-p-u p-y-p-u	M. Privat de Garilhe et al. : J. Biol. Chem. <u>234/751</u> , 1957
--------------------------------	--------------------------	--

Ca (bis(p-nitrophenyl)phosphat)₂ wird nicht gespalten

Nach Garilhe und Laskowski (33) baut die DNase I DNS zu durchschnittlich Tetranukleotiden ab, während die Abbauprodukte, die unter der Einwirkung von DNase II aus DNS entstehen, durchweg höher molekular sein sollen.

Schließlich sei noch erwähnt, daß manche Kokkenstämme in geeignetem Medium DNase im Überschuß produzieren und nach außen abgeben.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

1. Native DNase I (Desoxyribonuklease I) bewirkt in einer Konzentration von $3-10 \times 10^{-6}$ g/ml eine signifikante Steigerung der Mitoserate von Bäckerhefe.
2. Denaturierte DNase I zeigt bei der Hefe den gleichen Effekt wie native DNase. Dabei spielt es keine Rolle, ob bei 65, 100 oder 121°C denaturiert wurde.
3. Zwischen der Wirkung nativer und partiell oder total hydrolysierter DNase I auf Bäckerhefe besteht praktisch kein Unterschied.
4. Ein Aminosäurengemisch, das der DNase I genau entspricht, hat einen geringen vermehrungsfördernden Einfluß auf die Hefe, der sich statistisch nicht sichern läßt und der mit der Wirkung nativer und hydrolysierter DNase nicht vergleichbar ist.
5. Wenn das der DNase I entsprechende Aminosäurengemisch hydrolysiert wird, stellt sich der typische "DNase"-Effekt ein.
6. Der Versuch, aus dem wirksamen Aminosäurengemisch einzelne wirksame Aminosäuren oder Aminosäuregruppen herauszufinden, ist nicht erfolgreich.
7. Im Suspensionsmedium von Hefezellen, die mit dem hydrolysierten Aminosäurengemisch (d. h. mit dem DNase-I-Hydrolysat) angesetzt wurden, kann einige Zeit nach Beginn der Hefevermehrung eine DNase-Aktivität festgestellt werden, die in den Kontrollansätzen nicht gefunden wird.
8. Hydrolysiertes Rinderserumalbumin hat keinen Einfluß auf die Hefevermehrung.

Zusammenfassung der Diskussion

Der experimentelle Befund, daß denaturierte und hydrolysierte DNase I die Zellvermehrung der Bäckerhefe signifikant beschleunigt, kann als DNase-Effekt gedeutet werden.

Im zellfreien Überstand einer Hefelösung, in der sich Hefe unter Einwirkung hydrolysierten DNase I vermehrt hatte, fand sich nämlich eine erhebliche DNase-Aktivität.

Die Bäckerhefe entwickelt also bei Zugabe von DNase-I-Bausteinen eine extrazelluläre DNase-Aktivität.

Es können bisher keinen sicheren Anhaltspunkte dafür gefunden werden, was für ein Mechanismus dafür verantwortlich ist. Es wird ausgeschlossen, daß die hydrolysierte DNase Faktoren enthält, die die hefeeigene DNase entweder direkt aktiviert oder von einem Inhibitor befreit.

Es wird diskutiert, ob auch die Wirkung nativer DNase I auf Hefe über eine Aktivitätssteigerung der Hefe-DNase zustande kommt.

Der Befund, daß ein aus Aminosäuren zusammengesetztes DNase-"Hydrolysat" zur biologischen Wirksamkeit erst hydrolysiert werden muß, kann nicht erklärt werden. Es wird skizziert, in welcher Richtung weitere Untersuchungen zu erfolgen hätten.

Als positives Ergebnis der Arbeit wird herausgestellt, daß die biologische Wirkung veränderter DNase wahrscheinlich indirekt über die Wirkung eines intakten DNase-Moleküls erfolgt.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist ein Versuch, Genaueres über die biologischen DNase-Wirkungen herauszufinden.

Durch Veränderung, hauptsächlich durch schrittweise Hydrolyse der DNase sollte der wirksame Bestandteil des DNase-Moleküls ermittelt werden.

Wir fanden, daß zwischen der Wirkung nativer, denaturierter und hydrolysierten DNase praktisch kein Unterschied besteht. Wie ist ein solcher Befund zu erklären ?

Die Möglichkeit, daß die Wirkung der DNase durch eine oder wenige Aminosäuren bedingt ist, haben wir durch zusätzliche Versuche ausgeschlossen. Einzelne Aminosäuren blieben ohne Effekt.

Können wir die Wirkung eines hochwertigen Fermentproteinmoleküls überhaupt mit derjenigen eines Aminosäurengemisches vergleichen ? Muß es sich da nicht um Verschiedenes handeln ? Eine solche Konsequenz wäre sehr unbefriedigend. Wir müßten uns dann nicht nur um eine Theorie der DNase-Wirkung bemühen, sondern auch um eine der DNase-Bausteine-Wirkung.

Bei unseren weiteren Überlegungen gehen wir von demexperimentellen Befund aus, daß die Teilungsrate in Hefesuspensionen, denen wir denaturierte und hydrolysierte DNase zugegeben hatten, signifikant erhöht wird. Gleichzeitig ist im zellfreien Überstand dieser Hefelösungen eine deutliche DNase-Aktivität feststellbar. Diese, viskosometrisch ermittelt, kann nach unserem heutigen Wissen nur durch ein intaktes DNase-Molekül verursacht sein.

Die extrazelluläre DNase-Aktivität entsteht dann, wenn sich die Hefe bei Anwesenheit von DNase-Bausteinen vermehrt hat. Wir können jetzt leicht die Steigerung der Teilungsrate als typischen DNase-Effekt deuten und auf Zusatzannahmen, eine Theorie der DNase-Bausteine-Wirkung verzichten.

Nun muß aber geklärt werden, wie die Hefezelle mit Hilfe von DNase-Bausteinen DNase-Aktivitäten entwickeln kann.

Um eine adaptative Fermentbildung kann es sich dabei nicht handeln, da wir der Hefe die Fermentbausteine und nicht das Fermentsubstrat oder einen substratähnlichen Stoff angeboten haben.

Enthält unsere hydrolysierte DNase vielleicht Faktoren, die die DNase der Hefezellen aktivieren ?

Aus verschiedenen Gründen können wir das nicht annehmen. Zumindest kann es sich nicht um eine direkte Aktivierung durch einen Co-Faktor handeln. Die DNase-Analyse nach Gehrman und Okada (35) macht es wahrscheinlich, daß die DNase ein reines Fermentprotein ist. Es war uns ja auch nicht möglich, durch gezielte Versuche einen aktiven bzw. einen aktivierenden Bestandteil der hydrolysierten DNase zu ermitteln.

Schließlich weist ein Versuch aus der Zahn'schen Arbeitsgruppe in die gleiche Richtung. Danach wird die In-vitro-Aktivität nativer DNase I durch denaturierte DNase I nicht beeinflusst; durch Denaturierung (15' bei 80°C) ist also weder ein die DNase aktivierender noch ein die DNase inhibierender Faktor der DNase zu erhalten (36).

Endlich ist noch daran zu denken, daß durch unsere veränderte DNase in der Zelle ein Inhibitor ~~besetzt~~ wird, der bis dahin Hefe-DNase gebunden hatte. Chargaff (37) fand in der Hefe einen proteinartigen Hemmstoff für die DNase. Allerdings reagierte dieser Inhibitor spezifisch mit Hefe-DNase, nicht oder kaum mit Pankreas-DNase-T. Er würde sich dann erst recht nicht

mit Pankreas-DNase-I-Hydrolysat verbinden.

Kürzlich sind uns Arbeiten von Yamafuji (38) bekannt geworden, die uns zunächst auch für unser Thema, die "DNase"-Wirkung hydrolysierter Aminosäuren, bedeutungsvoll schienen.

Yamafuji konnte auf verschiedenem Wege in Seidenraupenlarven Polyeder-Viren induzieren. Er wies nach, daß die Virusinduktion im engsten Zusammenhang mit der Entstehung von Oximen aus alpha-Ketosäuren über ein zell-eigenes Fermentsystem steht. Mit der Virusproduktion steigt auch die DNase-Aktivität an. Es läßt sich also eine Verbindung zwischen alpha-Ketosäuren und DNase-Aktivitätssteigerung herstellen.

Nun sind in unserem Hydrolysat sehr wahrscheinlich zwei alpha-Ketosäuren enthalten, Brenztraubensäure und alpha-Ketobuttersäure, die bei der Hydrolyse von Serin und Threonin entstehen können (39). Eine solche Beziehung zwischen Oximen und einer DNase-Aktivitätssteigerung scheint aber in unserem Falle nicht vorzuliegen. Denn sonst hätte das Totalhydrolysat aus dem der DNase in Aminosäurezusammensetzung und Molekulargewicht ähnlichen Rinderserumalbumin auch biologisch wirksam sein müssen. Es hatte aber keinen Einfluß auf die Hefevermehrung. So führte uns jener Hinweis von Yamafuji auch nicht weiter.

Auf der anderen Seite müssen wir diskutieren, ob nicht die Wirkung nativer und veränderter DNase auf Hefe auf einer bisher nicht zu erklärenden Aktivitätssteigerung der hefeeigenen DNase beruht. Für die hydrolysierte DNase haben wir das bereits wahrscheinlich gemacht. Die biologische Aktivität, das Ausmaß der Steigerung der Mitoserate, ist bei nativer und veränderter DNase ungefähr gleich, letztere wirkt aber mit großer Wahrscheinlichkeit über die Aktivierung der hefeeigenen DNase. Es wäre nach unseren bisherigen Erfahrungen mit verschiedenen DNasen ein großer Zufall, wenn Pankreas-DNase-I genau so aktiv wäre wie Hefe-DNase (eine DNase vom Typ II), deren Aktivität irgendwie durch Pankreas-DNase-I-Hydrolysat gesteigert worden ist.

Für die Möglichkeit, daß auch die native DNase I über die hefeeigne DNase wirkt, wird sich experimentell nur schwer ein Hinweis finden lassen. Man müßte versuchen, im zellfreien Überstand von Hefe, die sich unter Zusatz von nativer DNase I vermehrt hat, zwei verschiedene DNase-Aktivitäten zu ermitteln, die der zugegebenen DNase I und die der hypothetischen Hefe-DNase-II. Das wird schwierig sein, wenn nicht unmöglich. Die Aktivität eines Ferments ist durch . in Konzentration nicht eindeutig bestimmt. Die Konzentration der vorgegebenen DNase I wäre sicher viel höher als die

der extra-zellulären Hefe-DNase. Wir messen die DNase-Aktivität viskosimetrisch. Nach unseren Auffassungen sind aber In-vitro- und In-vivo-Wirkung der DNase nicht identisch. Trotzdem sind wir in diesem Fall auf die viskosimetrische DNase-Aktivitätsbestimmung angewiesen, und wir müssen damit rechnen, daß im ungünstigsten Falle Spuren einer Hefe-DNase mit sehr starker biologischer Aktivität viskosimetrisch nicht erkennbar sind. Wenn also ein Versuch, zwei verschiedene extrazelluläre DNase-Aktivitäten zu ermitteln, fehlschläge, so würde das nicht gegen die intrazelluläre Aktivitätssteigerung einer hefeeigenen DNase sprechen. Im Grenzfall wäre diese zu gering, um extrazellulär meßbar zu sein, aber doch stark genug, um die biologischen DNase-Wirkungen an der Zelle verursachen zu können. So wird die Möglichkeit, die biologischen DNase-Wirkungen an der Bäckerhefe zu studieren, durch Methodik und Versuchstechnik begrenzt sein.

Für die Klärung der in der Diskussion aufgezeigten Probleme und Widersprüche schlagen wir vor, in Fortführung der vorliegenden Arbeit jene extrazellulären DNase-Aktivitäten weiter zu untersuchen und vor allem zu erforschen, worin der Unterschied zwischen einem nativen und einem hydrolysierten Aminosäurengemisch liegt. Denn, das ist zunächst das merkwürdigste und vielleicht auch das am leichtesten experimentell zu klärenden Ergebnis dieser Arbeit, daß ein qualitativ und quantitativ der DNase entsprechendes Aminosäurengemisch erst dann biologisch wirksam wird, nachdem es hydrolysiert worden ist. Um die unspezifische Wirkung eines Hydrolysats kann es sich dabei nicht handeln. Rinderserumalbumin bleibt nämlich auch nach Totalhydrolyse ohne Einfluß auf die Zellteilung der Bäckerhefe.

Als positives Ergebnis dieser Arbeit können wir feststellen, daß die biologische DNase-Wirkung auf Hefe- die Steigerung der Zellteilung- wahrscheinlich immer durch ein intaktes Fermentmolekül verursacht wird, auch wenn wir von veränderter DNase ausgegangen sind. Wie das im einzelnen möglich ist, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden, die über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

Methodik

Die verwendete DNase

Es wurde ausschließlich DNase I krist. (Worthington) verwendet.

Bäckerhefe

Um stets gleiche Versuchsbedingungen zu erhalten, war es sehr wichtig, möglichst immer die gleiche Hefe zu nehmen. Wir benutzten nur frische käufliche Bäckerhefe der Firma Moormann (Werne a. d. Lippe), die uns versicherte, daß sie jeweils über längere Zeit nur mit einem einzigen Hefestamm arbeite. Trotzdem erzielten wir unter sonst identischen Versuchsbedingungen (Temperatur, Nährlösung, Belüftung und DNase wurden immer gleich gewählt) z. T. unterschiedliche Ergebnisse. Vor allem schwankte die Vermehrungsfreudigkeit des benutzten angeblich reinen Hefestammes beträchtlich.

Wir schlossen daraus, daß die Hefe in verschiedenem Alter und Ernährungszustand auf den Markt kommt.

Es ist wahrscheinlich, daß ein wechselnder Teil der Zellen bei Versuchsbeginn bereits tot oder nicht mehr teilungsfähig ist. Vielleicht gelingt es der Herstellerfirma nicht, ihre Züchtungen zum jeweils gleichen Zeitpunkt abzubrechen. Dann hätten schon die Zellen der fabrikfrischen Hefe an verschiedenen Tagen ein unterschiedliches Alter. Wird der Transport verzögert, so verbrauchen die Zellen einen Teil der gespeicherten Nahrungsstoffe.

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor liegt darin, daß die Hefe von der Fabrik in Fässern zu einem Auslieferungslager transportiert, dort mit Wasser aufgefrischt wird und erst dann in den Einzelhandel kommt.

Der unterschiedliche Ausfall gleicher Versuche, die an verschiedenen Tagen ausgeführt werden, findet so leicht eine Erklärung. Abgesehen davon muß man ja bei jedem biologischen Versuch mit einer gewissen Streuung der Ergebnisse rechnen.

Die Nährlösung

Als Nährlösung verwendeten wir ein Zucker-Salz-Gemisch, das von Ochs zuerst angegeben wurde (1) :

KCl	0,013 mol	3% Saccharose
CaCl ₂	0,009 mol	6×10^{-6} g/ml Penicillin
NH ₄ Cl	0,05 mol	
NaH ₂ PO ₄	0,02 mol	(pH Wert dieser Lösung = 4,5)
MgCl ₂	0,05 mol	

Der Penicillinzusatz soll das Wachstum von Bakterien erschweren. - Es handelt sich um ein Mangelmedium, in dem sich die Hefe nur wenig vermehrt.

Kontinuierliche Hefezüchtung

Durch eine kontinuierliche Züchtung im "Hefechemostaten" läßt sich gut demonstrieren, daß sich die meisten Zellen der käuflichen Bäckerhefe in einem Ruhezustand befinden (oder sogar z. T. tot sind). Werden sie in Nährlösung suspendiert, so beginnen sie erst nach mehreren Stunden der Erholung mit lebhafter Vermehrungstätigkeit. Als Nährlösung kann ein Vollmedium genommen werden, das außer allen Hefe-Wuchsstoffen Glukose enthält. Wir gingen von der oben angegebenen Nährlösung aus, der wir noch Sulfat ($0,01 \text{ mol } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und Spurenelemente zugaben :

Na-Silikat	2,000 mg	Titriplex III	2,000 mg
KBr	2,200 mg	ZnSO ₄	0,230 mg
H ₃ BO ₃	0,200 mg	MnSO ₄	0,065 mg
FeCl ₃	0,020 mg	Na ₂ MoO ₄	0,020 mg
SrCl ₂	0,380 mg	LiCl	0,600 ug
AlCl ₃	0,003 mg	CoSO ₄	0,630 ug
RbCl	0,006 mg	CuSO ₄	0,130 ug
KJ	0,002 mg		

Eine ca. 0,1%ige Suspension von Hefe in Nährlösung wird in einem Kolben angesetzt. Durch einen automatischen Pumpmechanismus kommt laufend ebensoviel frische Nährlösung hinzu wie Hefesuspension durch einen Überlaufmechanismus gewonnen wird. Zur gleichmäßigen Verteilung sowie zur O₂-Versorgung der Zellen wird der Inhalt des Kolbens gut belüftet und dauernd in Bewegung gehalten. Die Konzentration der Hefelösung, bzw. die mittlere Zellzahl pro ml läßt sich aus der ablaufenden Flüssigkeit durch Zentrifugieren annähernd bestimmen. Die Ermittlung des Zellsedimentvolumens ist eine einfache und ausreichend genaue Methode, sich über den jeweiligen Stand der Hefevermehrung zu informieren.

Setzt man einen derart einfachen Chemostaten in Betrieb, so lassen sich nacheinander drei Phasen der Hefevermehrung unterscheiden :

1. Phase ohne Vermehrung. Die vorgegebene Hefesuspension wird durch den Zufluß frischer Nährlösung und den Abfluß von Hefelösung auf einen Bruchteil des Ausgangswertes verdünnt. Die in der Nährlösung enthaltenen Nährstoffe werden nicht ausgenützt.
2. Phase der ansteigenden Vermehrung. Die verbliebenen Zellen sprossen lebhaft aus. Das Zellsedimentvolumen steigt sprunghaft an.
3. Phase des Gleichgewichtes. Unter gleichbleibenden Bedingungen werden nun so viele Zellen produziert, wie nach außen abgegeben werden.

Theoretisch kann ein einmal erreichter Gleichgewichtszustand ad infinitum aufrecht erhalten werden. Leider war es uns nicht möglich, mit der Bäckerhefe einen solchen Zustand zu erreichen, da die immer in der Bäckerhefe enthaltenen Bakterien mit ihrer kürzeren Generationsdauer nach spätestens 4 - 5 Tagen überwucherten. (Die sterile Züchtung eines sterilen Hefestammes im Chemostaten wurde von uns nicht versucht.) Die mikroskopische Kontrolle der jeweils gewonnenen Hefelösung ergab, daß sich am Ende jenes oben unter 2. angeführten Stadiums fast nur junge lebhaft sprossende Zellen im Chemostaten befinden. Damit haben wir eine einfache Methode angegeben, wie man aus der käuflichen Bäckerhefe in 1 - 2 Tagen eine solch vitale Population von Hefezellen erhalten kann.

Rollertube

Wenn wir unsere Hefekulturen in Reagensgläsern 48 Std. in den Brutschrank stellen, so sedimentieren die Zellen nach kurzer Zeit und leiden in ihrer O_2 -Versorgung not. Die einzige Möglichkeit, eine größere Anzahl von Röhrchen gleichmäßig zu belüften, liegt in der Anwendung einer Rollertube-Apparatur. So kann die Sedimentation der Zellen verhindert werden. Läßt man die Rollertube-Apparatur mit möglichst großer Neigung rotieren, so vergrößert sich die Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche um ein Vielfaches. Leider beobachteten wir unter derart günstigen Wachstumsbedingungen trotz des Penicillingehaltes der Nährlösung nach etwa 25 Stud. Laufzeit eine starke Bakterienwucherung. Bei vorzeitigem Abbruch, nach ca. 20 Std. waren die Versuchsergebnisse nicht immer befriedigend. Außerdem wollten wir uns auf keinen Fall in die Gefahr begeben, durch Anwesenheit von Bakterien verändertes Hefewachstum zu erhalten. Sie kamen wir von der Benutzung der Rollertube-Apparatur wieder ab. Sie wurde nur in Versuch 1 (Tab. 1) benutzt.

Bakterienwachstum in unseren Versuchen.

Die käufliche Bäckerhefe enthält immer einige Bakterien. Unter bestimmten Versuchsbedingungen, z.B. im gut belüfteten Chemostaten, aber auch bei der Benutzung der Rollertube-Apparatur, können die Bakterien sich so stark vermehren, daß die Ergebnisse unseres Versuchs mit Hefe beeinträchtigt werden. Das gilt besonders für die (noch zu schildernde) lichtelektri-

sche Trübungsmessung, da die Bakterien eine im Vergleich zur Hefe ins Gewicht fallende Lichtstreuung bewirken. Die Sedimentvolumenbestimmung wird hingegen wegen der geringen Größe der Bakterien kaum beeinflusst. Bei der Zellzählung gelingt es nicht immer, die Bakterien, meist Milchsäurebakterien, von kleinen Hefesporen zu unterscheiden. Bei unseren Versuchen (40 - 48 Std. Wachstum im Reagensglas ohne Belüftung) war jedoch die Verunreinigung mit Bakterien, wenn überhaupt, so gering, daß unsere Ergebnisse dadurch praktisch nicht verändert wurden.

In unserer Arbeitsgruppe hat kürzlich Ochs (41) die Beschleunigung der Zellteilung durch DNase an einem reinen Hefestamm unter sterilen Kautelen nachgewiesen. Es ergaben sich keine Abweichungen zu den Resultaten unserer Versuche, die wir ausschließlich mit der vereinzelt Bakterien enthaltenden käuflichen Bäckerhefe durchführten.

Ansatz, Verlauf und Auswertung der Versuche

Mit Ausnahme des in Tab. 1 (S. 27) wiedergegebenen Versuches, bei dem wir mit einer Rollertube Apparatur arbeiteten, wählten wir immer die gleiche Versuchsanordnung. Stellvertretend für alle anderen schildern wir Ansatz, Verlauf und Auswertung unseres Versuchs Nr. 5 (s. auch Tab. 5 Seite 30). Es sollen die Wirkungen nativer und verschieden lang hydrolysierten DNase und eines qualitativ und quantitativ der DNase entsprechenden Aminosäurengemischs miteinander verglichen werden.

Herstellung bzw. Zusammensetzung des Aminosäurengemisches: Wir gehen von der von Gehrman und Okada angegebenen DNase-I-Analyse aus (35)

Aminosäure	Mol.-zahl	Mol.-gew.	abgewog. Menge	Aminosäure	Mol.-zahl	Mol.-gew.	abgewog. Menge
Asp. säure	65	132,1	8,59 mg	Serin	62	105,1	6,52 mg
Threonin	36	119,1	4,29 "	Cystein	3	121,2	0,36 "
Glut. säure	43	147,1	6,33 "	Arginin	26	174,2	4,53 "
Alanin	35	89,1	3,12 "	Prolin	19	115,1	2,19 "
Methion.	12	149,2	1,79 "	Glycin	26	75,1	1,95 "
Isoleuc.	21	131,2	2,76 "	Valin	42	117,1	4,92 "
Tyrosin	29	181,2	5,26 "	Leucin	41	131,2	5,38 "
Phen. al.	20	165,2	3,30 "	Lysin	33	146,2	4,82 "
Tryptoph.	5	204,2	1,02 "	Histid.	22	155,2	3,41 "

(Das Molekulargewicht der DNase ergibt sich mit 61566, nachdem man von der Gesamtsumme der 18 Teile noch 540 (= Gesamtzahl der Aminosäuren) X 18 (= Molek. gew. der Wassers-) abgezogen hat, ... des Wasserverlustes bei Zustandekommen der Peptidbindungen.)

DNase-Hydrolysen : in 3 zugeschmolzenen Glasröhrchen hydrolysieren wir DNase in n-HCl 1, 30 und 77 Std. lang bei einer Temperatur von 110°C . Nach Beendigung der Hydrolyse neutralisieren wir mit der entsprechenden Menge n-NaOH.

Versuchsansatz : wir stellen eine 0,01%ige Suspension frischer Bäckerhefe in Nährlösung her. (Das entspricht etwa 2×10^7 Zellen pro ml.)

Von dieser Hefestammlösung geben wir je 125 ml in 6 Erlenmeyer-Kolben :

K	125 ml	Hefestammlsg. + 5 ml 0,9 %iger NaCl
V	"	+ 0,650 mg DNase in 5 ml 0,9%iger NaCl
H ₁	"	+ 5 ml des Hydrolysats 1 (1 Std. Hydrolysedauer) mit 0,650 mg hydrolysierter DNase
H ₃₀	"	+ 5 ml unseres Hydrolysats 30
H ₇₇	"	+ 5 ml unseres Hydrolysats 77
AS	"	+ 0,752 mg Aminosäuren (= 0,650 mg DNase- äquivalenten) in 5 ml 0,9 % NaCl

Nun füllen wir für jede der 6 Chargen 12 Reagensgläser mit je 10 ml, verschließen die Röhrchen mit Parafilm und stellen sie in einen auf 37°C eingestellten Brutschrank.

Von dem Rest der Hefestammlösung bestimmen wir die Ausgangswerte der Lichtstreuung (siehe unten), des Zellsedimentvolumens und der Zellzahlen.

Nach 20 Std. Hefewachstum- und -vermehrung schütteln wir alle Reagensgläser kräftig auf. Ob wir damit die O_2 -Versorgung der Zellen nachhaltig verbessern, ist fraglich, es handelt sich vielleicht eher um einen symbolischen Akt als um eine wirksame Belüftung. Die schlechte bzw. fehlende Belüftung ist von uns jedoch beabsichtigt. Wie schon ausgeführt, kommt es so nicht zur Bakterienvermehrung, während sich die Hefe noch ausreichend zu teilen vermag.

Nach insgesamt 41 Stunden brechen wir den Versuch ab.

Um uns einen möglichst guten Überblick über Hefewachstum und -vermehrung in den verschiedenen Versuchsreihen zu verschaffen, werteten wir fast alle Versuche 3-fach aus :

1. Bestimmung der Zellzahl durch Auszählen.
2. Sedimentvolumenbestimmung.
3. photoelektrische Bestimmung am Eppendorf'schen Photometer - Nephelometrie.

Die Zellzählung. Von den 12 Röhrchen einer Charge werden aus 6 beliebigen je 1 ml entnommen und mit einigen Tropfen Formol und alkoholischer Jodlösung versehen. Infolge ihres Glykogengehalts lassen sich die Zellen mit Jod anfärben, was die Zählung erleichtert. Wir benutzen die Leukozytenkammer von Neubauer. Dabei berücksichtigen wir jeweils nur den 4. Teil aller Felder, die wir dafür um so häufiger wieder neu anfüllen. Ein solches Vorgehen ist wichtig, denn beim Eimpipettieren von Hefelösung in die Kammer werden weniger als 1 mm³ unseres ursprünglichen Aliquots von 6 ml genommen. Es ist sehr schwierig, eine derart geringe Menge im immer gleichen Verhältnis der Flüssigkeit und der relativ großen Zellen in die Kammer zu bringen.

Die Verteilung der Zellen in den einzelnen Feldern ist sehr unterschiedlich. Um eine subjektive Fehlerquelle in der Auswahl der auszuzählenden Felder auszuschalten, zählen wir nur die Zellen in den diagonalen Quadranten.

Wir füllen also zur Zählung der Zellen einer Charge die Neubauerkammer 10 mal, zählen jedesmal die Zellen in $4 \times 0,001 \text{ mm}^3$. Insgesamt erfassen wir damit $0,04 \text{ mm}^3$ Hefesuspension einer Charge. Dem entsprechen etwa 800-1000 Zellen zu Beginn des Versuchs und 1600-3200 am Ende.

Bei diesem Zählmodus beträgt die Streuung der Zellzahl 14-22%. Ein Versuch, noch mehr Zellen auszuzählen, hat nach unseren Erfahrungen im Verhältnis zum Zeitaufwand wenig Erfolg. Die Streuung wird dadurch nicht wesentlich verkleinert.

Zellzahlen der Hefestammlösung unseres Versuchs, Zählung vor Beginn der Zellvermehrung: (Jede Zahl = Zellzahl pro $0,001 \text{ mm}^3$)

17, 15, 29, 20, 12, 25, 18, 21, 20, 22, 15, 20, 12, 13, 17, 19, 13, 17, 18, 19, 20, 16, 18, 17, 16, 14, 12, 19, 17, 15, 21, 16.

Die Summe beträgt 563, der Mittelwert $\bar{x}$ 17,6; Streuung = $\pm$ 3,7.

Bei Abbruch des Versuchs nach 41 Std. ergeben sich für die einzelnen Chargen folgende Zellzahlen :

Kontrolle	56, 62, 55, 58, 79, 53, 44, 70, 49, 74, 67, 64, 54
K	72, 54, 51, 43, 59, 70, 59, 63, 62, 49, 58, 52, 50, 67 61, 57, 78, 57, 57, 64, 76, 68, 48, 71, 75, 42, 60 Summe = 2408 Mittelwert = 60,2 Streuung = $\pm 9,7$
V_{-6}	74, 60, 73, 62, 70, 74, 63, 63, 72, 59, 43, 47, 89
5×10^{-6}	82, 63, 63, 79, 65, 57, 75, 68, 78, 98, 56, 69, 57, 63
g/ml	93, 77, 75, 74, 68, 56, 52, 63, 81, 98, 68, 67, 96
DNase	Summe = 2790 Mittelwert = 69,8 Streuung = $\pm 13,1$
H_1	66, 68, 70, 71, 82, 70, 69, 67, 54, 68, 66, 62, 72 89, 72, 75, 58, 53, 82, 61, 73, 57, 45, 53, 69, 79, 65 46, 65, 88, 65, 61, 72, 77, 90, 88, 68, 56, 53, 51 Summe = 2690 Mittelwert = 67,3 Streuung = $\pm 11,5$
H_{30}	74, 68, 49, 61, 72, 63, 47, 52, 67, 70, 83, 68, 55 68, 72, 45, 69, 74, 76, 61, 75, 68, 63, 56, 66, 83, 79 69, 56, 63, 68, 73, 63, 48, 70, 79, 72, 71, 63, 74 Summe = 2653 Mittelwert = 66,3 Streuung = $\pm 9,5$
H_{77}	79, 58, 95, 74, 94, 72, 79, 63, 67, 69, 99, 98, 58 61, 65, 64, 53, 85, 52, 69, 83, 90, 77, 68, 74, 63, 64 72, 68, 61, 49, 97, 63, 87, 65, 60, 75, 87, 77, 66 Summe = 2900 Mittelwert = 72,5 Streuung = $\pm 13,3$
AS	59, 64, 49, 92, 70, 52, 56, 80, 66, 56, 68, 53, 74 64, 78, 58, 56, 60, 75, 61, 92, 83, 66, 69, 52, 68, 68 41, 67, 55, 64, 68, 73, 50, 57, 58, 66, 59, 74, 47 Summe = 2568 Mittelwert = 64,2 Streuung = $\pm 11,4$

(Eine übersichtliche Tabelle des vorliegenden Versuchs, auf der auch die Zellzahlen der Fermentansätze in % der Kontrolle berechnet sind, findet sich Seite 30.)

Die Sedimentvolumenbestimmung liefert sehr zuverlässige Ergebnisse mit geringer Streuung.

Jedem der 12 Röhrchen einer Reihe werden nach Beendigung des Versuchs 6 ml entnommen, je $2 \times 6 \text{ ml} = 12 \text{ ml}$ werden vorzentrifugiert. Das Sediment wird quantitativ in Hämatokrit-Röhrchen übertragen und erneut zentrifugiert (5 min, 2000 U). Da unsere Hefelösungen zu wenig Zellen ent-

enthalten, ergibt einmaliges Zentrifugieren keine ablesbaren Werte. Bei unseren Versuchen ist jedoch die Zellzahl von größerer Bedeutung als das Zellvolumen, da wir ja nachweisen wollen, daß die DNase eine mitosefördernde Substanz ist. Wenn das stimmt, so wäre es denkbar, daß unter DNase-Einwirkung mehr kleine Zellen entstehen, das Gesamtvolumen aber gleich bleibt. Eine genauere Differenzierung dieser Probleme findet sich in einer Arbeit von G. Mey (40).

Das Sedimentvolumen unserer Hefestammlösung beträgt 1.

Diese Zahl gibt die Teilstriche des Zentrifugenröhrchens an : im Sedimentvolumen 1 sind etwa $2 \cdot 10^8$ Zellen enthalten. Bei Versuchsabbruch, nach 41 Stunden Hefewachstum und -vermehrung, ermitteln wir folgende Werte:

K	3,5	3,6	3,6	3,8	4,2	4,8
	Summe	23,5	Mittelwert	3,9	Streuung	$\pm 0,4$
V	5,0	5,1	5,2	5,2	5,3	5,9
	Summe	31,7	Mittelwert	5,3	Streuung	$\pm 0,4$
H ₁	4,8	4,9	4,9	5,0	5,1	5,4
	Summe	30,1	Mittelwert	5,0	Streuung	$\pm 0,2$
H ₃₀	5,4	5,4	5,5	5,5	5,6	6,4
	Summe	33,8	Mittelwert	5,6	Streuung	$\pm 0,4$
H ₇₇	5,1	5,3	5,8	5,9	6,0	6,1
	Summe	34,2	Mittelwert	5,7	Streuung	$\pm 0,4$
AS	3,8	3,9	4,0	4,0	4,2	4,5
	Summe	24,4	Mittelwert	4,1	Streuung	$\pm 0,2$

(s. auch Tab. 5, Seite 30)

Die Nephelometrie. Oft lassen sich feinere Unterschiede in der Zellzahl verschiedener Hefelösungen durch die Messung der Lichtstreuung am Photometer von Eppendorf herausarbeiten. Es wird dabei vorausgesetzt, daß alle Zellen in der Lösung gleich groß sind und gleiche optische Eigenschaften besitzen. Dann wäre die Streuung, die seitlich einfallendes Licht an diesen miteinander identischen Teilchen erfährt, proportional der Anzahl der Teilchen. Obwohl jene Annahme bei uns nicht zutrifft und ein ziemlicher Grö-

Benunterschied zwischen einer ausgewachsenen Zelle und einer jungen Knospe besteht, ist man immer wieder über die Leistungsfähigkeit der Nephelometrie erstaunt. Die Ergebnisse sind zuverlässig und würden bei Routineuntersuchungen zur annähernden Zellbestimmung ausreichen. In der Regel führen wir die Lichtmessung vor der Sedimentvolumenbestimmung und der Zellzählung durch. ---

Die Trübung unserer Stammlösung beträgt 10. Diese Zahl gibt den Ausschlag des Photometers an, der vor Benutzung mit einem Farbglas bekannter Trübung geeicht wird.

Bei Versuchsabbruch messen wir folgende Werte :

K	57, 56, 58, 59, 60, 60, 55, 55, 56, 57, 57, -			
	Summe 630	Mittelwert 57,3	Streuung $\pm$	1,2
V	79, 83, 83, 82, 76, 81, 81, 75, 77, 78, 79, -			
	Summe 874	Mittelwert 79,5	Streuung $\pm$	1,9
H ₁	84, 81, 81, 77, 82, 80, 89, 82, 83, 77, 79, 81			
	Summe 976	Mittelwert 81,3	Streuung $\pm$	4,1
H ₃₀	69, 83, 83, 75, 79, 82, 80, 80, 80, 84, 92, 85			
	Summe 972	Mittelwert 81,0	Streuung $\pm$	5,6
H ₇₇	73, 75, 75, 74, 80, 79, 75, 77, 77, 78, 80			
	Summe 843	Mittelwert 76,6	Streuung $\pm$	2,5
AS	64, 63, 65, 59, 66, 68, 66, 67, 70, 65, 53, 65			
	Summe 771	Mittelwert 64,3	Streuung $\pm$	4,5

Statistische Sicherung der Befunde. Die Entscheidung, ob Unterschiede der Mittelwerte der Zellzahlen verschiedener Versuchsreihen noch als zufällig anzusehen sind oder nicht, treffen wir mit dem parameterfreien x-Test von van der Waerden und Nievergelt (42). Sie schreiben in "Tafeln zum Vergleich zweier Stichproben mittels x-Test und Zeichentest":

"Kann die gefundene Differenz rein zufällig sein, oder ist sie größer als die normalerweise durch Zufall sich ergebenden Differenzen ... ? Um diese Frage zu entscheiden, wurde bisher meistens STUDENTs Test angewandt. Man nimmt dabei an, daß die $n = g + h$ Versuchsobjekte unabhängig normal verteilt sind mit gleicher Streuung .. Sind die beiden Voraussetzungen der Normalverteilung und der gleichen Streuung erfüllt, so ist STUDENTs Test

sehr gut." (Seite 1)

Diese beiden Voraussetzungen sind bei uns nicht erfüllt; für die Verteilung und Streuung bei unseren Versuchen trifft der von van der Waerden und Nievergelt geschilderte Fall zu : "Man hat es aber häufig mit Verteilungen zu tun, die stark von der Normalverteilung abweichen oder bei denen die Streuung der x sehr verschieden ist von der Streuung der y. In solchen Fällen verliert STUDENTs Test einen guten Teil seiner Kraft." "Man hat deshalb andere Testverfahren entwickelt, die nur von der Rangordnung der x und y abhängen und von der Annahme der Normalverteilung unabhängig sind. Man nennt sie Rangtests oder auch parameterfreie Tests." (Seite 2)

Wir haben bei dem auf den letzten Seiten ausführlich dargestellten Versuch sowohl den t-Test (STUDENTs Test) als auch den x-Test angewandt :

	Zellzahlen in % U. K.	x-Test	t-Test
K	100 $\pm$ 16		
V	116 $\pm$ 22	p 0,01	p < 0,001
H ₁	112 $\pm$ 19	nicht gesichert ^{x)}	p < 0,01
H ₃₀	110 $\pm$ 16	nicht gesichert ^{x)}	p < 0,01
H ₇₇	120 $\pm$ 22	p 0,005	p < 0,001
AS	107 $\pm$ 19	nicht gesichert ^{x)} x) für p = 0,025	nicht gesichert für p = 0,05

Aus dieser Zusammenstellung geht eindeutig hervor, daß der von uns vorgezogene x-Test für die Zellzahlen unseres Versuchs stärker ist als der t-Test. Zum Vergleich der beiden Tests heißt es in dem nun schon mehrfach zitierten Werk (Seite 8): "Man verliert . . . fast nichts an Teststärke, wenn man den x-Test anwendet. Das gilt unter der Annahme der Normalverteilung und der gleichen Streuung. Ist diese Annahme nicht erfüllt, so hat der x-Test manchmal eine viel größere Teststärke als STUDENTs Test."

Wenn eine Umkehrung dieser Aussage erlaubt ist, könnte man auch folgern: die Behauptung, es handele sich in unseren Beispielen nicht um Normalverteilung und nicht um gleiche Streuung, wird auch dadurch unterstützt, daß der x-Test viel schärfer ausfällt als der t-Test.

Unsere Angaben, die sich auf den Vergleich von x- und t-Test beziehen, können leicht überprüft werden. Die dazu nötigen Einzelergebnisse des zugrundeliegenden Versuchs finden sich Seite 23 dieser Arbeit.

Versuche und Tabellen mit Diskussion.

Die Wirkung nativer DNase. Wir arbeiteten fast immer mit einer DNase-Konzentration von 5×10^{-6} g/ml. Von seltenen Ausnahmen abgesehen, bei welchen das absolute Hefewachstum gering war, bewirkte diese DNase-Konzentration eine hochsignifikante Steigerung der Zellvermehrung.

Wir versuchten, die untere Grenze der DNase-Wirkung festzustellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ochs (1), der noch 10^{-7} g/ml DNase in ihrem Effekt sichern konnte, waren in unserem Versuch $1-5 \times 10^{-7}$ g/ml praktisch wirkungslos. (Tab. 1)

Tabelle 1 Verschiedene DNase-Konzentrationen

	Trübung, % von		Sediment, % von		Zellzahl, % von		Signifik.
	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	x-Test (42)
K	365	100 ± 5	325	100 ± 9	159	100 ± 22	-
V _{0,1}	351	96 ± 3	278	86 ± 11	175	110 ± 23	-
V _{0,3}	352	97 ± 2	278	86 ± 11	159	100 ± 16	-
V _{0,5}	377	103 ± 3	312	96 ± 5	174	110 ± 16	-
V _{3,0}	483	132 ± 5	415	128 ± 14	224	140 ± 22	p < 0,005
V _{5,0}	672	184 ± 7	507	156 ± 12	260	163 ± 30	p < 0,005

K = Kontrollansatz V = DNase-Ansatz, Angabe in 10^{-6} g/ml

Die Werte bei T=O sind ein Maß für das absolute Hefewachstum. Sie geben die Meßwerte am Ende des Versuchs in % der Anfangswerte, zum Zeitpunkt T=O, an.

Unter der Spalte: % von Kontr. sind die Meßwerte in % der Kontrollen angegeben.

Der x-Test wird in allen Versuchen nur für die Zellzahlen berechnet.

21 Stud. Laufzeit in einer Rollertube-Apparatur. Temp., Nährlösung in allen Versuchen gleich, wie unter "Methodik" angegeben.

Es ist nach unseren Erfahrungen durchaus möglich, daß in einem anderen Versuch, mit schneller wachsender Hefe, auch Konzentrationen von unter 10^{-6} g/ml DNase die Zellteilung der Hefe noch beschleunigen.

Wir haben stets eine gewisse Streuung der DNase-Wirkung beobachtet, was durch die einzige Veränderliche unserer Versuche, die Hefe, bedingt sein muß. So liegt die Zellzahl in 4 unserer Fermentansätze mit jeweils 5×10^{-6} g/ml DNase um 16, 23, 39 und 53 % über den Kontrollwerten. (Tab. 5, 6, 9, 8) Bei Anwendung des x-Testes läßt sich die Signifikanz des Unterschiedes auf dem 0,005 Niveau wegen der hohen Streuung von durchschnittlich 20 % erst ab etwa 18 % Zellzahlsteigerung erreichen.

Die Wirkung denaturierter DNase. In einem ersten Versuch erhitzen wir DNase bei 65°C 3, 7, 16, 35 und 90 min lang. Diese DNase, die in vitro keine Aktivität mehr entfalten würde, zeigt keine Beeinträchtigung ihrer biologischen Wirksamkeit. (Tab. 2)

Tab. 2 Bei 65°C denaturierte DNase (Angabe der Lichtstreuung)

	22 Std. Wachstum		46 Std. Wachstum		Signifik. x-Test
	%v. T = O	% von K	%v. T = O	% von K	
Kontrolle	324	100 $\pm$ 3	653	100 $\pm$ 4	-
V ₀	384	119 $\pm$ 2	860	132 $\pm$ 2	p < 0,005
V ₃	393	121 $\pm$ 4	870	133 $\pm$ 5	"
V ₇	375	116 $\pm$ 3	861	132 $\pm$ 3	"
V ₁₆	378	117 $\pm$ 3	861	132 $\pm$ 4	"
V ₃₅	374	116 $\pm$ 4	838	128 $\pm$ 5	"
V ₉₀	373	115 $\pm$ 3	869	133 $\pm$ 5	"

V : DNase-Ansätze, 5×10^{-6} g/ml. Die Zahlen geben die Hydrolysedauer in min. an. In diesem Versuch wie in allen folgenden wurde nicht belüftet.

In einem nächsten Versuch konnten wir zeigen, daß auch abgekochte DNase nichts von ihrer biologischen Wirksamkeit eingebüßt hat. Hier scheint sogar die 30 min. bei 100°C denaturierte DNase die native noch zu übertreffen. Allerdings läßt sich darüber nichts Genaues aussagen, da nur die Trübung (Lichtstreuung, Nephelometrie) gemessen wurde. (Tab. 3) Schließlich testeten wir DNase, die 30' bei 120°C und 1 atü autoklaviert worden war. Wie aus Tab. 4 hervorgeht, zeigt sich kein Unterschied zur Wirkung nativer DNase.

Tab. 3 Wirkung von DNase, die im kochenden Wasserbad denaturiert wurde.
(Versuchsdauer 44 Std.)

	% von T=O	% von Kontr.	Signif.
Kontr.	688	100 $\pm$ 6	-
V ₀	842	122 $\pm$ 5	p < 0,005
V ₅	918	133 $\pm$ 9	"
V ₃₀	943	145 $\pm$ 13	"

V : Hefevermehrung mit 5×10^{-6} g/ml DNase. Die Zahlen geben die Dauer der Hitze-Denaturierung an.

Es wurde nur die Lichtstreuung gemessen.

Tab. 4 Wirkung denaturierter DNase (30' bei 121°C)

	nach 42 Std.		nach 49 Std.		nach 66 Std.		Signif. x-Test
	% v. T=O	% v. K	% v. T=O	% v. K	% v. T _O	% v. K.	
Kontr.	432	100 $\pm$ 11	539	100 $\pm$ 15	696	100 $\pm$ 17	-
V	525	127 $\pm$ 9	691	126 $\pm$ 6	974	140 $\pm$ 14	p < 0,005
V _d	481	111 $\pm$ 10	650	121 $\pm$ 6	979	141 $\pm$ 4	

Kontr. : fermentfreier Ansatz; V : DNase, V_d : denaturierte DNase.

Konzentration wie üblich.

Die Zahlen geben die Lichtstreuung an.

Die Wirkung hydrolysierter DNase. Zur DNase-Wirkung ist bei der Hefe offenbar kein intaktes DNase-Molekül erforderlich. Es ist kaum anzunehmen, daß ein denaturiertes Fermentprotein molekül mit einem Molekulargewicht von über 60 000 in toto wirksam ist. Es war daran zu denken, daß die DNase ein aktives Zentrum besitzt, bestehend aus relativ wenigen Peptidbindungen. Dann würde vielleicht eine partielle Hydrolyse, durch die die zur Fermentwirkung nicht notwendigen Aminosäuren abgespalten würden, die DNase nicht unwirksam machen.

Erst eine stärkere oder völlige Hydrolyse würde dann den DNase-Effekt aufheben.

So verglichen wir die Wirkung nativer, partiell und total hydrolysierter DNase miteinander. Verlauf und Auswertung dieses Versuchs sind unter "Methodik" genau angegeben.

Tab. 5 DNase nativ und hydrolysiert (1, 30 und 77 Std.)

	Trübung, % von		Sediment, % von		Zellzahl, % von		Signif. x-Test
	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	
K	573	100 $\pm$ 2	392	100 $\pm$ 11	428	100 $\pm$ 16	-
V	795	139 $\pm$ 3	528	135 $\pm$ 9	496	116 $\pm$ 22	p < 0,01
H ₁	813	155 $\pm$ 8	502	128 $\pm$ 5	478	112 $\pm$ 19	nicht ges.
H ₃₀	810	154 $\pm$ 11	563	144 $\pm$ 10	471	110 $\pm$ 16	"
H ₇₇	766	143 $\pm$ 4	570	146 $\pm$ 10	515	120 $\pm$ 22	p < 0,005
AS	643	122 $\pm$ 9	407	104 $\pm$ 6	456	107 $\pm$ 19	nicht ges.

K : fermentfreier Kontrollansatz

V : Ansatz mit 5×10^{-6} g/ml DNase

H : Hefevermehrung unter Zusatz von DNase-Hydrolysat, Konz. wie DNase-Hydrolyse 1, 30 und 77 Stud. in n-HCl bei 110°C

AS: Ansatz mit einem der DNase äquivalenten Aminosäurengemisch. Zusammensetzung s. S.

Versuchsdauer 41 Std.

Der x-Test wurde jeweils für die Zellzahlen berechnet. Die Beschleunigung der Zellteilung der Chargen H₁, H₃₀ und AS konnte mit dem x-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,025$ nicht gesichert werden. (S. auch Seite 26)

Nach den in Tab. 5 zusammengefaßten Ergebnissen scheint weder eine partielle noch eine totale Hydrolyse die DNase unwirksam zu machen. (Bei 77 Std. Hydrolysendauer in n-HCl bei 110°C ist eine Totalhydrolyse als sicher anzunehmen.) Als Kontrolle für das Totalhydrolysat testeten wir auch ein qualitativ und quantitativ der DNase entsprechendes Aminosäurengemisch, das im Gegensatz zu den DNase-Hydrolysaten keine wesentliche Beschleunigung der Zellteilung der Hefe verursacht.

Wir waren uns nicht sicher, ob wir die geringen Unterschiede der wachstums- und entwicklungsfördernden Wirkung der nativen DNase und der drei Hydrolysaten bewerten sollten.

Zur Klärung dieser Frage wiederholten wir den Versuch z. T.. (Da die Hefe in ihrer Ansprechbarkeit auf native und veränderte DNase in einer gewissen Breite schwankt, kann es durchaus indiziert sein, einen Versuch zu wiederholen.)

So testeten wir noch einmal native, partiell und total hydrolysierte DNase-

Wie aus Tab. 6 hervorgeht, zeigen sich diesmal deutliche Unterschiede zwischen der Wirkung der partiell und total hydrolysierten DNase.

Tab. 6 Wirkung partiell und total hydrolysierter DNase

	Trübung, % von		Sediment, % von		Zellzahl, % von		Signif. x-Test
	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	
K	538	100 $\pm$ 4	275	100 $\pm$ 12	270	100 $\pm$ 17	-
V	780	145 $\pm$ 5	448	163 $\pm$ 10	331	123 $\pm$ 20	p< 0,005
H _p	586	109 $\pm$ 3	413	150 $\pm$ 20	277	103 $\pm$ 20	-
H _t	1035	192 $\pm$ 12	702	255 $\pm$ 4	336	124 $\pm$ 25	p< 0,005

K : fermentfreier Kontrollansatz

V : DNase-Ansatz

H : Ansatz mit partiell hydrolysierter DNase, 46 Std. in n-HCl

H_p : Ansatz mit DNase-Totalhydrolysat, 25 Std. in 6n-HCl

H_t : Ansatz mit DNase-Totalhydrolysat, 25 Std. in 6n-HCl

Hydrolysen bei 110°C.

Fermentkonzentration 5×10^{-6} g/ml

Versuchsdauer 41 Std.

Dieses unterschiedliche Verhalten ließ bei uns zunächst den Verdacht aufkommen, daß wir es mit verschiedenen Effekten zu tun haben, daß es sich bei der Wirkung der voll hydrolysierten DNase nicht mehr um einen DNase-Effekt handelt. Wie sollten wir es uns sonst erklären, daß bei fortschreiten-der Hydrolyse die biologische Wirksamkeit der DNase zunächst ab- und dann wieder zunimmt ?

Solche zusätzlichen Annahmen erschienen uns sehr unbefriedigend. Sie vermochten vor allem nicht zu erklären, wie der aus Tab. 5 hervorgehende Unterschied zwischen der Wirkung des aus DNase durch Hydrolyse entstandenen und des von uns zusammengesetzten Aminosäurengemisches zustande-kommt.

Mit der Aminosäurenkombination, die wir, qualitativ und quantitativ wie in der DNase vorkommend, vorgenommen hatten, wollten wir uns ja ohne Hydrolyse ein DNase-"Hydrolysat" herstellen. Der Unterschied der Zellzah-len ist signifikant (p = 0,005). Mit dem nach den Ergebnissen der DNase-Analyse (35) zusammengesetzten Aminosäurengemisch konnte also kein DNase-Effekt erreicht werden.

Wir überlegen : wenn die von Gehrman und Okada (35) angegebene DNase-Analyse richtig ist und wir bei der Abwägung der einzelnen Amino-säuren (s. auch Seite 20) keinen Fehler begangen haben, kann der einzige

Unterschied der beiden auf verschiedenem Wege erhaltenen Aminosäurenkombinationen nur dadurch bedingt sein, daß das eine hydrolysiert wurde und das andere nicht. Vielleicht war es uns nicht gelungen, nach der Hydrolyse mit HCl exakt mit NaOH zu neutralisieren, so daß pH-Verschiebungen auftraten, die ein gesteigertes Hefewachstum zur Folge hatten. So untersuchten wir kurz das Hefewachstum bei verschiedenen pH-Werten.

Der Einfluß des pH-Wertes auf das Hefewachstum. Wir fanden die diesbezüglichen Angaben in der Literatur sehr voneinander abweichend (43). Danach ist der Einfluß des pH-Wertes auf Wachstum und Vermehrung der Bäckerhefe von Stamm zu Stamm verschieden. Immerhin scheinen die meisten Hefestämme in einem weiten pH-Bereich zwischen 3-7 optimal zu wachsen (43). So war es nicht wahrscheinlich, daß bei unseren Hydrolyse-Versuchen etwaige pH-Wert-Verschiebungen eine Rolle gespielt hatten. Ein entsprechender Versuch bestätigt das. (Tab. 7)

Tab. 7 Hefewachstum bei verschiedenen pH-Werten

	Trübung	Sediment	Zellzahl	(Angaben in % v. K)
K				
pH 4,1	100 $\pm$ 7	100 $\pm$ 6	100 $\pm$ 21	
pH 3	90 $\pm$ 4	120 $\pm$ 23	97 $\pm$ 15	
pH 2	32 $\pm$ 4	43 $\pm$ 11	36 $\pm$ 8	
pH 5	113 $\pm$ 8	100 $\pm$ 3	113 $\pm$ 20	

Dieser Versuch wurde ohne DNase-Zusatz ausgeführt. Das Hefewachstum in unserer üblichen Nährlösung (pH 4,1) diene als Vergleich (Kontrolle). Auffallend ist, daß bei pH 3 das Sedimentvolumen, bei pH 5 die Zellzahl größer ist als bei der Kontrolle. Das legt die Vermutung nahe, daß im stärker sauren Bereich die Vermehrung der Hefezellen eher gehemmt wird als ihr Wachstum.

Bei pH 2 ist offenbar jegliches Hefewachstum aufgehoben. Die beobachteten Unterschiede sind nicht so groß, daß sie die Vermutung stützen könnten, pH-Verschiebungen hätten in unsere Hydrolyseversuchen verändertes Hefewachstum verursacht. Übrigens verändert sich während des Hefewachstums der pH-Wert des Suspensionsmediums. In unserem Versuch fiel das pH in der K-Reihe von 4,1 auf 3,4 nach 45 Stunden, in der bei pH 5 angesetzten Reihe auf 3,6.

In einem weiteren Versuch testeten wir noch einmal native und hydrolysierte DNase in ihrem Einfluß auf die Hefevermehrung. Wie aus Tab. 8 ersichtlich, übertrifft in diesem Versuch die hydrolysierte DNase die native in ihrer Wachstumsförderung, während die Beschleunigung der Zellteilung durch native und hydrolysierte DNase etwa gleich ist. Die pH-Werte wurden kontrolliert. Es zeigten sich keine Abweichungen.

Tab. 8 Die Wirkung nativer und total hydrolysierter DNase

	Trübung, % von		Sediment, % von		Zellzahl, % von		Signif. x-Test
	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	
K	787	100 $\pm$ 5	467	100 $\pm$ 7	343	100 $\pm$ 10	-
V	1064	135 $\pm$ 8	495	106 $\pm$ 5	523	153 $\pm$ 24	p < 0,005
H	1340	170 $\pm$ 15	695	149 $\pm$ 11	547	160 $\pm$ 25	p < 0,005

Konzentration der nativen (V) und der hydroly. (H) DNase 5×10^{-6} g/ml.

Hydrolyse 24 Std. in 6n-HCl bei 110°C.

Versuchsdauer 47 Std.

Partielle Hydrolyse scheint den DNase-Effekt abzuschwächen (Tab. 5 und 6). Wird die DNase völlig hydrolysiert, so erhält man eine Kombination von Aminosäuren, die eine der DNase zumindest ähnliche biologische Wirkung besitzt. Ein entsprechendes von uns zusammengesetztes "natives" Aminosäurengemisch, das mit dem durch Hydrolyse entstandenen identisch sein sollte, zeigt keinen der DNase vergleichbaren Effekt. Etwaige bei der Hydrolyse auftretende Fehler haben wir durch Zusatzversuche ausgeschlossen.

Wenn man die Richtigkeit der von Gehrman und Okada angegebenen DNase-Analyse nicht anzweifelt und dennoch zwischen dem unhydrolysierten und dem hydrolysierten Aminosäurengemisch ein Unterschied besteht, so müssen wir annehmen, daß bei der Hydrolyse irgendetwas passiert.

Dann sollten unsere nativen Aminosäuren durch Hydrolyse wirksam werden. Die Ergebnisse der drei folgenden Versuche bestätigen die Richtigkeit dieser Überlegungen. (Tab. 9, 10 und 11)

Tab. 9 DNase, Aminosäuren nativ (AS) und hydrolysiert (AS_h)

	Trübung, ‰ von		Sediment, ‰ von		Zellzahl, ‰ von		Signif. x-Test
	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	
K	492	100 ± 9	331	100 ± 5	270	100 ± 12	-
V	805	164 ± 8	492	149 ± 5	375	139 ± 22	p < 0,005
AS	543	110 ± 8	450	136 ± 12	278	103 ± 14	-
AS _h	867	176 ± 15	685	207 ± 24	419	155 ± 22	p < 0,005

Versuchsdauer 47 Std.; Hydrolyse der AS in 6n-HCl 24 Std. bei 110°C; Neutralisation mit der 6-fachen Menge n-NaOH

Tab. 10 DNase, Aminosäuren nativ und hydrolysiert

	Trübung ‰ von K	Sediment ‰ von K	Zellzahl ‰ von K	Signif. x-Test
K	100 ± 8	100 ± 9	100 ± 10	-
V	169 ± 11	186 ± 8	148 ± 23	p < 0,005
AS	112 ± 8	109 ± 7	100 ± 15	-
AS _h	133 ± 6	160 ± 9	115 ± 21	p < 0,005

Versuchsbedingungen wie oben (Tab. 9)

Tab. 11 DNase, Aminosäuren nativ und hydrolysiert

	Trübung ‰ von K	Sediment ‰ von K	Zellzahl ‰ von K	Signif. x-Test
K	100 ± 6	100 ± 11	100 ± 18	-
V	138 ± 10	131 ± 17	117 ± 17	p < 0,01
AS	114 ± 13	116 ± 11	103 ± 12	-
AS _h	218 ± 16	178 ± 9	124 ± 23	p < 0,005

Konz. der DNase bzw. der Aminosäuren 5×10^{-6} g/ml

Versuchsdauer 47 Std.. Hydrolyse wie in Versuch 9.

Während die nativen Aminosäuren keinen oder nur einen geringen Einfluß auf Hefewachstum und -vermehrung haben, fördern die hydrolysierten Aminosäuren hochsignifikant die Zellteilung der Hefe. Zunächst versuchten wir, dieses überraschende Ergebnis durch die Annahme zu erklären, daß bei der Hydrolyse aus einer oder mehreren Aminosäuren eine wirksame Substanz entsteht, die den fraglichen DNase-Effekt der hydrolysierten Aminosäuren verursacht. Wenn von 18 Aminosäuren eine infrage kommt, dann sollte es möglich sein, diese eine in drei Versuchen herauszufinden.

Wir teilten unsere 18 Aminosäuren zunächst in 3 Gruppen zu je 6 auf. Die erste Gruppe enthielt hauptsächlich die basischen Aminosäuren : Arginin, Valin, Lysin, Histidin, Alanin und Phenylalanin.

In einer zweiten Gruppe vereinigten wir Methionin, Serin, Tyrosin, Tryptophan, Prolin und Cystein, also vorwiegend die S- und OH-haltigen Aminosäuren. Die 3. Gruppe schließlich enthielt Glycin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. In einem entsprechenden Versuch zeigte es sich, daß durch die Aufteilung der Aminosäuren ihre Wirksamkeit verloren geht. Offenbar sind für den "DNase-" -Effekt der hydrolysierten Aminosäuren mehr oder weniger alle erforderlich. (Tab. 12)

Tab. 12 Die Wirkung einzelner hydrolysierter Aminosäuregruppen

	Trübung, % von		Sediment, % von		Zellzahl, % von	
	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.
Kontrolle	500	100	367	100	283	100
DNase	729	146	533	145	339	120
AS I	514	103	361	98		
AS II	565	113	400	109	246	87
AS III	538	108	396	108		

Hydrolyse der Aminosäuren wie in den anderen Versuchen.

Konz. der Aminosäuren : 5×10^{-6} g/ml DNase-Äquivalente

AS I Arginin, Valin, Lysin, Histidin, Alanin, Phen. alanin

AS II Methion. , Serin, Tryptoph. , Tyrosin, Prolin, Cystein

AS III Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Isoleucin, Threonin

Von den 3 Chargen mit den Aminosäuregruppen I, II und III bestimmten wir nur die Zellzahlen der zweiten, bei der das Hefewachstum gegenüber der DNase-freien Kontrolle nach Ermittlung der Trübung und des Sediment-

volumens noch am meisten beschleunigt schien. Die Zählung war aber dann enttäuschend. (Nur 87 % der Kontrollwerte.)

Wir mußten jetzt annehmen, daß zur biologischen Aktivität unseres Hydrolysats alle 18 Aminosäuren erforderlich sind. Doch waren uns längst Zweifel darüber gekommen, ob es sich bei der Wirkung der hydrolysierten Aminosäuren, die genau dem DNase-Hydrolysat entsprachen, um einen DNase-Effekt handeln konnte. Wir mußten durch einen entsprechenden Versuch die Möglichkeit ausschließen, daß es sich um einen unspezifischen Fördereffekt handelt, der auch durch ein der DNase ähnliches hydrolysiertes Protein zu erreichen ist. Wir wählten dafür Rinderserumalbumin, das in Molekulargewicht und Aminosäurezusammensetzung der DNase ähnlich ist. (Frühere Versuche mit diesem Albumin hatten ergeben, daß es nativ keine der DNase vergleichbare Wirkung auf Bäckerhefe hat (44).

Tab. 13 Die Wirkung eines hydrolysierten Albumins

	Trübung, % von		Sediment, % von		Zellzahl, % von		Signif. x-Test
	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	T=O	Kontr.	
Kontr.	338	100 $\pm$ 8	227	100 $\pm$ 12	206	100 $\pm$ 28	-
DNase	681	177 $\pm$ 13	378	167 $\pm$ 9	306	148 $\pm$ 28	p < 0,005
Album.	515	133 $\pm$ 11	360	159 $\pm$ 16	191	92 $\pm$ 19	-

Das Albumin wurde 24 Std. in 6N-HCl bei 110°C hydrolysiert.
Versuchsdauer 46 Std.

Tab. 13 zeigt, daß ein hydrolysiertes Albumin die Zellteilung nicht beschleunigt. Die starke Zunahme des Zellvolumens durch das Hydrolysat deuten wir als unspezifisch-metabolischen Effekt. Bei Anwesenheit von Aminosäuren kann die Eiweißsynthese in der Zelle schneller ablaufen - die Zelle wächst schneller. Beim typischen DNase-Effekt ist dagegen nicht die vermehrte Eiweißsynthese, sondern die beschleunigte Zellteilung charakteristisch.

Der Befund, daß hydrolysiertes Albumin im Gegensatz zu den hydrolysierten Aminosäuren bzw. der hydrolysierten DNase keine Beschleunigung der Zellteilung bewirkt, läßt sich bisher nicht erklären. Offenbar werden bei der Hydrolyse von Aminosäuren und DNase wirksame hitzebeständige Stoffe frei oder erst gebildet. Aus bisher noch unbekannten Gründen scheint das bei der Hydrolyse von Albumin nicht möglich zu sein.

Es ist sichergestellt, daß am Froschei und am Seeigellei erhitzte oder gar hydrolysierte DNase unwirksam ist (25, 24).

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei der Wirkung unseres Aminosäurehydrolysats um eine DNase-Wirkung handelt, beschritten wir nun einen ganz anderen Weg : wir prüften die zellfreien Überstände der Hefesuspensionen, die wir mit den hydrolysierten Aminosäuren angesetzt hatten, auf DNase-Aktivitäten. (Es handelt sich um die in Tab. 10 und 11 wiedergegebenen Versuche).

Die DNase-Aktivitätsbestimmungen erfolgten viskosimetrisch. Nach 48 Std. Hefevermehrung wurden die Hefelösungen der Versuchsreihen K, V, AS und AS_b (Versuche 10 und 11) zentrifugiert, der zellfreie Überstand auf seine viskositätsvermindernde Wirkung auf DNS-Lösungen geprüft.

Diese DNase-Aktivitätsbestimmungen ergaben, daß die zellfreien Überstände der Versuchsreihe, der wir vor Versuchsbeginn die hydrolysierten Aminosäuren zugesetzt hatten, nach 48 Stunden Versuchsdauer DNase enthielten. In der fermentfreien Kontrolle und der Charge, in der die Hefe bei Anwesenheit nativer Aminosäuren gewachsen war, fanden sich keine vergleichbaren DNase-Aktivitäten.

Wir müssen also annehmen, daß die Hefezelle bei Zugabe der hydrolysierten DNase-Bausteine eine vermehrte DNase-Aktivität entwickelt, die dann ihre typische Wirkung, die Steigerung der Mitoserate entfaltet. Ein Teil der entstandenen DNase-Aktivitäten diffundiert offenbar aus der Zelle heraus. Wir haben uns in der Diskussion um Erklärungsmöglichkeiten dieser experimentellen Befunde bemüht.

Eine Theorie der biologischen DNase-Wirkung

Die DNasen gelten bisher als hydrolytisch wirkende Fermente. Sie spalten *in vitro* DNS in Oligo- und Polynukleotide auf. Nach Garilhe und Laskowski (33) baut die DNase I DNS zu durchschnittlich Tetranukleotiden ab, während die DNS-Fragmente, die durch DNase II entstehen, durchweg größer sein sollen. Eine solche rein hydrolytische Wirkung der DNase kann offenbar unter bestimmten Bedingungen auch *in vivo* vorliegen, nämlich dann, wenn DNS an den falschen Platz geraten ist. So konnten Zahn und Mitarbeiter (16) beim Kaninchen eine wahrscheinlich als reaktiv zu deutende DNase-Aktivitätssteigerung nach DNS-Injektion in die Blutbahn beobachten.

Versuchen wir nun, auch die biologische DNase-Wirkung, die Beschleunigung der Zellteilung, mit einer rein hydrolytischen Aktivität der DNase zu erklären. Zunächst ist daran zu denken, daß

sie indirekt extrazellulär wirkt, d. h., daß sie die aus abgestorbenen Hefezellen freigewordene DNS zerlegt. Die entstehenden Nukleotide könnten in die Zellen gelangen, als DNS-Bausteine zur Verfügung stehen und so die DNS-Produktion und ausgehend davon die Teilungsrate der Zellen erhöhen.

Es sollen hier nicht alle Argumente gegen eine solche Hypothese angeführt werden. Sie wird am eindeutigsten durch den experimentellen Befund widerlegt, daß DNS und DNase, gleichzeitig zu Seeigelkeimen gegeben, den DNase-Effekt aufheben (24). Nukleotide haben, mit oder ohne DNase gegeben, keinen Einfluß auf die Entwicklung von Amphibieneiern. Bei hoher Nukleotid-Konzentration tritt sogar Hemmung ein (25).

Wenn die DNase-Wirkung nicht extrazellulär zustande kommen kann, so müssen wir annehmen, daß das Fermentmolekül in die Zellen eindringt und dort aktiv wird. Für eine intrazelluläre Wirkung der DNase sprechen auch unsere Versuche mit hydrolysierten DNase. Wir konnten es wahrscheinlich machen, daß der "DNase"-Effekt hydrolysierten DNase indirekt über eine DNase-Aktivitätssteigerung verursacht wird.

Nun wäre folgerichtig zu diskutieren, ob die DNase-Wirkung durch Hydrolyse intrazellulärer DNS bedingt ist.

Dann würde die DNase eine hypothetische Reserve-DNS abbauen, so daß durch erhöhtes Angebot von Nukleotiden der DNS-Aufbau beschleunigt werden könnte.

Es ist aber unwahrscheinlich, daß allein durch vermehrtes Angebot der nötigen Bausteine die DNS-Produktion wesentlich gesteigert werden kann. Ein solcher Mechanismus könnte nur vorübergehend wirksam sein. Wenn die DNase überhaupt eine hypothetische Reserve-DNS angreifen kann, dann müßte sich diese bald erschöpfen. Die DNase wirkt aber beschleunigend auf die Hefevermehrung während vieler Tage. In dieser Zeit ist ein Vielfaches an DNS gebildet worden. So scheint es uns als nicht wahrscheinlich, daß die biologische DNase-Wirkung allein durch intrazelluläre Hydrolyse von DNS bedingt ist.

Seitdem es Kornberg (45) gelungen ist, DNS in vitro zu synthetisieren, sind in Wiederholung und Fortführung der Kornberg'schen Arbeiten eindeutige Befunde dafür erhoben worden, daß die DNase auch bei der DNS-Synthese eine wichtige Rolle spielen muß. Im folgenden lassen sich gute Argumente für die Theorie anführen, daß die biologische Wirkung der DNase durch eine Beteiligung des Ferments an der Autoreduplikation, d. h. der Synthese der DNS zu erklären ist.

Kornberg konnte aus den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten, dem Ferment Desoxyribonukleotid-Polymerase (DRNP) und geringen Mengen DNS als Starter unter Pyrophosphatabspaltung in vitro DNS synthetisieren. Nun ist die Höhe

der DNS-Produktion eines solchen Systems vor allem vom Reinheitsgrad der DRNP und von der Beschaffenheit der Starter-DNS abhängig.

Wir geben eine kurze Zusammenstellung der für eine Theorie des DNase-Angriffspunktes wichtigsten Befunde von Kornberg (45), Lehman (46) und Bollum (47):

1. Hohe DNase-Aktivitäten infolge DNase-Verunreinigung der DRNP verhindern das Auftreten hochpolymerer DNS.
2. Enthält die DRNP zu wenig DNase und wird als Starter-DNS native Doppelspiralige DNS benutzt, so läßt sich keine DNS-Produktion beobachten. Native DNS allein ist kein Primer.
3. Enthält die DRNP keine DNase und wird als Starter einstrangige Phagen-DNS verwendet, so entsteht mit großer Geschwindigkeit DNS. Einstrangige DNS ist ein ausgezeichnete Primer.
4. Auch denaturierte DNS - durch Untersuchungen von Doty (48) als zumindest fast vollständig einstrangig erwiesen - ist ein sehr guter Starter.
5. Native DNS ist als Starter wirksam, wenn DNase zugegeben wird.

Weiterhin ist hervorzuheben, daß geringe Mengen von DNase die Synthesegeschwindigkeit der DNS stark beschleunigen, während höhere DNase-Konzentrationen eine DNS-Synthese verhindern. Das deckt sich auffallend mit unseren (25) bzw. Chevremonts (7) Befunden, daß kleine, noch physiologische Fermentmengen die Zellvermehrung fördern, hohe DNase-Dosen jedoch zum Stillstand bringen. So können wir z. T. die Ergebnisse der künstlichen DNS-Herstellung mit unseren an lebenden Organismen gewonnenen Erfahrungen vereinbaren.

Entscheidend ist, daß man bei dem von Kornberg zuerst angegebenen Enzym-Substrat-System als Starter-DNS entweder einstrangige DNS oder native DNS + DNase benutzen kann. Daraus schließen wir, daß die DNase die DNS zumindest teilweise einstrangig macht, so daß diese dann die Rolle des Starters spielen kann. Diese Folgerung wird auch von Khorana (49) ausgesprochen: "The function of unwinding double-stranded DNA to a single stranded DNA could then also be ascribed to pancreatic desoxyribonuclease in the E. coli system."

Welchen Wert hat nun die Hypothese, daß die Autoreduplikation von DNS nur über einstrangige DNS erfolgen kann ?

Eine solche Hypothese steht im Einklang mit allem, was man bisher über die DNS weiß. Geht man von dem Watson-Crick-Schema (50) aus, so ist die Verdoppelung eines DNS-Moleküls möglich, wenn die Doppelspirale entdrillt wird und jeder Einzelstrang nach den bekannten Regeln wieder zu einem Dop-

peistrang vervollständigt wird. Dabei muß die DRNP zwischen den vier Nukleosidtriphosphaten unterscheiden können, um den Polynukleotidfaden, den sie zur Vervollständigung der einstrangigen DNS zusammenknüpft, jeweils mit dem richtigen Nukleotid zu verlängern, damit in dem neugebildeten DNS-Molekül immer Adenin und Thymin und Guanin und Cytosin gegenüber liegen.

So könnte man bei der DNS-Synthese folgendes Zusammenwirken von DNase und Polymerase (DRNP) vermuten : DNase entdrillt native DNS und ermöglicht damit der Polymerase den Angriffspunkt an den einstrangigen Molekülanteilen und somit den Aufbau der beiden mit der elterlichen DNS identischen Zwillingsmoleküle.

Wir möchten vorläufig die Hypothese prüfen, daß die DNase bei der DNS-Synthese die elterliche DNS denaturiert und damit zum Primer macht.

Damit würden wir der DNase eine zentrale Rolle bei der Steuerung der DNS-Synthese zuschreiben.

Alle bisherigen Befunde, vor allem die DNase-Aktivitätsänderungen im Laufe der zellulären Entwicklung und die Steigerung der Zellvermehrung durch DNase, sind mit dieser Hypothese vereinbar.

Literatur

1. H. G. Ochs : Wirkungen einer Desoxyribonuklease I und des Östradiol-17 beta auf die Vermehrungsrate von *Saccharomyces cerevisiae*. Inauguraldissertation der medizinischen Fakultät der Universität Frankfurt. Frankfurt am Main, 1961
2. V. Allfrey, A. E. Mirsky : J. Gen. Physiol. 36, 227, 1953
3. G. Siebert, K. Lang, S. Lucius-Lang, G. Stark, L. Herbert, G. Roßmüller, G. und H. Stöckel : Z. physiol. Chem. 295, 229, 1953
4. V. Allfrey, A. E. Mirsky, S. Osawa : in : The chemical basis of heredity. McElroy and Glass, Baltimore 1957, John Hopkins Press
5. R. L. Lester : J. Amer. Chem. Soc. 75, 5448, 1953
6. M. Beljanski : Biochem. Biophys. Acta 15, 425, 1954
7. M. und S. Chevremont : Comptes rend. séances Soc. Biol. 151, 1621, 1957
8. G. Gilissen : Experientia 15, 200, 1959
9. O. Necas : Biologie (CSR) 7, 452, 1958
10. S. Brody, B. Thorell: Biochim. Biophys. Acta 25, 579, 1957
11. S. Brody : Nature 182, 1386, 1958
12. R. J. Goldacre, B. Sylvén : Nature 184, 63, 1959
13. H. Malmgreen, B. Sylvén : Cancer Res. 19, 525, 1959
14. R. E. Kunkee, A. B. Pardee : Biochim. Biophys. Acta 19, 236, 1956
15. O. D. Kowlessar, K. I. Altmann, L. H. Hempelmann : Arch. Biochem. 54, 355, 1955
16. R. K. Zahn, A. Docter, B. Heicke, H. Kuhlemann, G. Ochs, E. Torz, R. Torz, W. Ziegler, G. Zahn : Nature 182, 1679, 1958
17. K. E. Paschkis : Cancer Res. 18, 981, 1958
18. H. Lettré, H. J. Thom : Naturwiss. 41, 144, 1954
19. H. Friedrich-Frekxa, F. G. Zaki : Ztschr. f. Naturforschg. 9b, 394, 1954
20. P. R. White : The Cultivation of animal and Plant Cells. Ronald Press Cy. New York 1954
21. H. Eagle : Fed. Proc. 19, 387, 1960
22. R. K. Zahn, H. K. Müller, S. Müller, G. Zahn : Biochem. Ztschr. 331, 518, 1959

23. R. K. Zahn, K. Rajewsky, G. G. Kiefer, R. Kiefer, L. Eitel, G. Zahn : Naturwiss. 46, 518, 1959
24. R. K. Zahn, G. und R. Kiefer, G. Zahn : Biochem. Ztschr. 334, 49, 1960
25. R. K. Zahn, G. G. Kiefer : Exp. Cell. Res. 19, 460, 1960
26. R. K. Zahn : Nature 184, 1324, 1959
27. R. K. Zahn : Biochem. J. 76, 66, 1960
28. R. K. Zahn : nicht veröffentlicht
29. M. Shimomura, M. Laskowski : Biochim. Biophys. Acta 26, 198, 1957
30. E. Fredericq, A. Oth/ Biochim. Biophys. Acta 29, 281, 1958
31. L. Cunningham, M. Laskowski / Biochim. Biophys. Acta 11, 590, 1953
32. J. Shack : J. Biol. Chem. 226, 573, 1957
33. M. Privat de Garilhe, M. Laskowski : J. Biol. Chem. 215, 269, 1955
34. L. B. Cunningham, B. W. Catlin, M. Privat de Garilhe : J. Amer. Chem. Soc. 78, 4642, 1956
35. G. Gehrman, S. Okada : Biochim. Biophys. Acta 23, 621, 1957
36. R. K. Zahn : mündliche Mitteilung
37. E. Chargaff, S. Zamenhof : J. Biol. Chem. 180, 727, 1949
38. K. Yamafuji : Enzymologia 19, 53, 1958
39. B. Fianck, J. Knoke : Chem. Ber. 90, 2450, 1957
40. G. Mey : in Vorbereitung
41. R. K. Zahn, H. G. Ochs : mündl. Mitteilung
42. B. L. van der Waerden, E. Nievergelt : Tafeln zum Vergleich zweier Stichproben mittels x-Test und Zeichen-Test. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1956
43. F. Reiff, R. Kautsmann, H. Luers : Die Hefen, Verlag Hans Carl Nürnberg 1960
44. R. K. Zahn, G. Tuschy : nicht veröffentlicht
45. A. Kornberg : Harvey Lectures, Ser. 53, 83, 1959
46. I. R. Lehmann : Ann. N. Y. Acad. Sci. 81, 776, 1959
47. F. J. Bollum : Fed. Proc. 19, 305, 1960

48. N. Sueka, J. Marmur, P. Doty : Nature 183, 1429, 1959
49. H. G. Khorana : in : The Nucleic Acids. E. Chargaff and J. N. Davidson, Acad. Press Inc. N. Y. -London 1960
50. J. D. Watson, F. H. C. Crick : Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 18, 123, 1953

Lebenslauf

Ich wurde am 18. 4. 1936 in Danzig als Sohn des Ingenieurs Dr. Hans Tuschy und seiner Ehefrau Eva, geb. Schwenke, geboren. 1937 siedelten wir nach Frankfurt/M. -Höchst über. Hier, in Bernburg an der Salle und in Sandhof/Mecklenburg besuchte ich die Volksschule.

Von 1946 bis 1952 war ich Schüler des Höchster Leibniz-Realgymnasiums. Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Frankfurter Helmholtz-Schule, an der ich im Februar 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Im Frühjahr 1956 begann ich mein Medizinstudium in Frankfurt. Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung wechselte ich für zwei Semester an die Universität Zürich über, um dann wieder nach Frankfurt zurückzukehren und im Februar 1962 die ärztliche Prüfung abzulegen.

